



MD 3655 G2 2008.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3655** (13) **G2**
(51) Int. Cl.: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 49/303 (2006.01)
C07C 49/323 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

<p>(21) Nr. depozit: a 2007 0238 (22) Data depozit: 2007.09.03</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.07.31, BOPI nr. 7/2008</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ROȘU Tudor, RO; COTOVAIA Aliona, MD; DONALD Poirier, CA; JENNY Roy, CA; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) Inhibitor al leucemiei mieloidă umane în bază de bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza unui compus coordinativ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate fi aplicată în medicină pentru profilaxia și tratamentul leucemiei mieloidă.

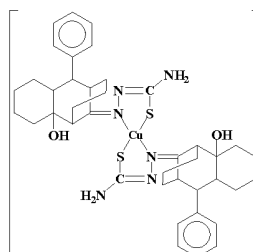
Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei mieloidă umane se propune bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru cu formula :

5

10

15

2



Revendicări: 2

MD 3655 G2 2008.07.31

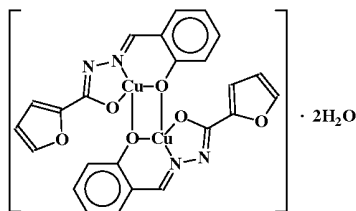
MD 3655 G2 2008.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza unui compus coordinativ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate fi aplicată în medicină pentru profilaxia și tratamentul leucemiei mieloidă.

- 5 Din compușii coordinativi, care inhibă leucemia mieloidă, cel mai înalt efect antiproliferativ a fost obținut în cazul di(μ -O_{fenoxi})-di[N-(2-oxi-1-benzali)-N¹- α -oxifuralihidrazino(2-)cupru] cu formula [1]:



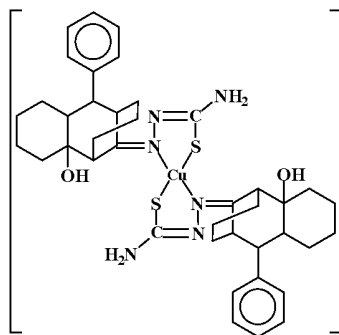
10

Complexul dat inhibă creșterea și multiplicarea celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă la concentrația 10^{-6} M.

- 15 Dezavantajul utilizării di(μ -O_{fenoxi})-di[N-(2-oxi-1-benzali)-N¹- α -oxifuralihidrazino(2-)cupru] constă în faptul că el nu posedă o activitate antiproliferativă înaltă, inhibând la concentrația dată numai 12% de celule și până acum nu a găsit aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea arsenalului de inhibitori ai leucemiei mieloidă cu activitate biologică înaltă.

- 20 Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei mieloidă umane se propune bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2/7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru cu formula:



- 25 Complexul dat, proprietățile lui și procedeul de obținere nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității antiproliferative, care depășește de 1,83 ori caracteristicile analoage ale di(μ -O_{fenoxi})-di[N-(2-oxi-1-benzali)-N¹- α -oxifuralihidrazino(2-)cupru].

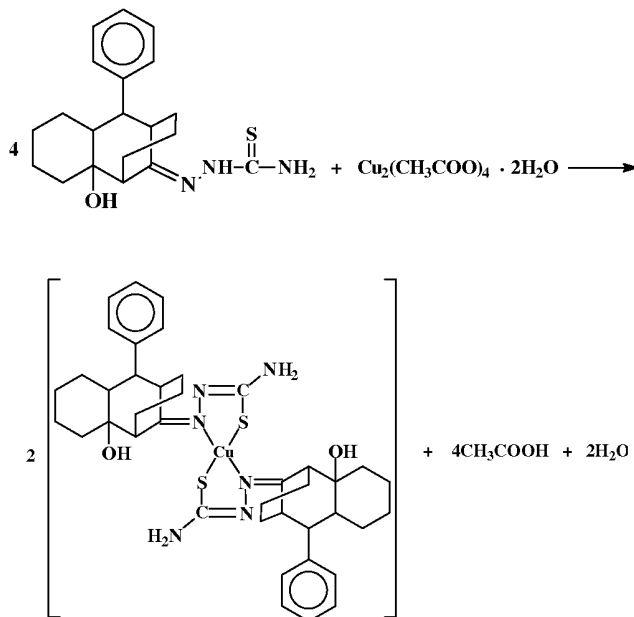
- 30 Rezultatul invenției constă în aceea că pentru prima dată în calitate de inhibitor al leucemiei mieloidă umane se propune bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2/7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru, care conține o combinație nouă de legături chimice.

Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55°C) ale Cu₂(CH₃COO)₄ · 2H₂O cu 2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2/7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazona, luate în raport molar de 1 : 4. Reacția decurge în 3,5...4,0 ore conform următoarei scheme :

35

MD 3655 G2 2008.07.31

4



5

Mecanismul reacției date constă în aceea că în amestecul reactant grupa -NH-C(S)-NH_2 a fragmentului tiosemicarbazonic trece din forma tiocetonică tautomerică în forma tioenolică (-N=C(OH)-NH_2). În prezența acetat-ionului, care joacă rolul de reagent protono-acceptor, decurge deprotonizarea grupelor hidroxilice ale fragmentelor tioenolice. Obținuți în acest mod, doi anioni ai azometinei respective monodeprotonizate coordonează la ionul de cupru(2+), având rolul de ligand N,S-bidentat. Tiosemicarbazona 2-hidroxi-8-fenil-triciclo[7.3.1.0.2,7]/tridecan-13-unei inițială a fost sintetizată după metoda descrisă în (Rosu T., Gulea A., Georgescu R. Complexes of 3 d Metal Ions with Thiosemicarbazones: Synthesis and Antimicrobial Activity.//Molecules, 2007, N.12, p. 782-796).

Exemplu de obținere a bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo[7.3.1.0.2,7]/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru.

Se amestecă 50 ml de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 2-hidroxi-8-fenil-triciclo[7.3.1.0.2,7]/tridecan-13-on-tiosemicarbazonă cu 2,5 mmol de $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, trecută în suspensie în 30 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit ($50 \dots 55^\circ\text{C}$) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 3,5...4,0 ore. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde-deschis, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer.

S-a determinat, % : C – 62,18; H – 6,58; Cu – 8,00; N – 10,48.

Pentru $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{CuN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ s-a calculat, % : C – 61,75; H – 6,94; Cu – 8,16; N – 10,80.

Procedeu de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 63% față de cel calculat teoretic. Acest complex este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

Valoarea conductivității molare ($3 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) a bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo[7.3.1.0.2,7]/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru a arătat că el este neelectrolit.

Descompunerea termică a complexului revendicat decurge în două etape (248...450 și 453...690°C). Pierderea de masă în primul interval de temperatură se explică prin pierderea a unei molecule de 2-hidroxi-8-fenil-triciclo[7.3.1.0.2,7]/tridecan-13-on-tiosemicarbazonă. Rămășița finală a fost analizată cu ajutorul spectroscopiei IR, identificându-se ca CuO , iar partea de masă a cuprului corespunde cu cea calculată anterior.

35

MD 3655 G2 2008.07.31

5

În spectrul IR al complexului revendicat valoarea frecvenței $\nu_{C=N^1} = 1591 \text{ cm}^{-1}$ descrește, iar valoarea frecvenței $\nu_{N^1-N^2} = 1108 \text{ cm}^{-1}$ crește în comparație cu valorile spectrului ligandului ($\nu_{C=N^1} = 1633$; $\nu_{N^1-N^2} = 1075$; $\nu_{N^2-H} = 3191$; $\nu_{N^4-H} = 3338$; $\nu_{C=S} + \nu_{C=N} = 798, 1302$; $\nu_{OH} = 3424, 1132 \text{ cm}^{-1}$). Schimbarea nesemnificativă a frecvențelor ν_{N^2-H} sugerează că 2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazona coordonează la ionii de metal prin intermediul atomului N¹. Benzile ν_{N^2-H} , $\nu_{C=S}$ și banda asociată $\nu_{C=S} + \nu_{C=N}$ dispar, dar apare banda ν_{C-S} la 590 cm^{-1} . Acest comportament confirmă coordinarea ligandului în formă tienolică deprotonată de către atomul de sulf.

10 Valoarea energiei (12630 cm^{-1}) de tranziție d-d (${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$), obținută din spectrele electronice ale bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru sugerează o aranjare tetraedrică distorsionată a ionului de metal.

Valoarea g din spectrele REP ale complexului revendicat ($g_x = 2,040$, $g_y = 2,116$ și $g_z = 2,210$) confirmă simetria uniaxială, care corespunde următoarei secvențe: $g_z > g_y$; $g_z > g_x$.

15 Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziția și structura probabilă a compusului revendicat.

Exemplu al utilizării bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru în calitate de inhibitor al leucemiei mieloide umane

20 Celulele leucemiei mieloide umane HL-60 obținute din Colecția Culturilor Tip American (American Type Culture Collection, Rockville, MD) au fost cultivate în formă de suspensie în mediul RPMI-1640 suplimentat cu 10% (V/V) ser embrionic de Sovine, 2 mM de L-glutamină, 100 UI penicilină/ml și 100 μg de streptomycină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO_2 la 37°C . Celulele au fost amestecate de 2...3 ori pe parcursul săptămânii, pentru a le păstra în fază omogenă. După aceasta celulele au fost plasate în vase Falcon din plastic pentru culturi cu 24 de compartimente (2 cm^2 /celulă) la densitatea inițială de $1 \cdot 10^5$ celule/ml/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compusului declarat în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în cate trei compartimente.

30 Datele experimentale obținute privind studiarea proprietăților antiproliferative ale bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru demonstrează că la concentrația 10^{-5} M el inhibă 100%, iar la concentrația 10^{-6} - 20% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide. Datele obținute indică că acest complex de cupru(II), după activitatea antiproliferativă, depășește de 1,83 ori caracteristicile analoage a compusului din cea mai apropiată soluție.

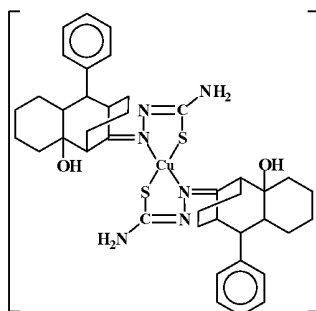
35 Proprietățile depistate ale bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei mieloide.

MD 3655 G2 2008.07.31

6

(57) Revendicări:

- 5 1. Bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru cu formula:



- 10 2. Compus coordinativ conform revendicării 1, care posedă proprietăți de inhibitor al leucemiei mieloide umane.

15

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3098 G2 2006.07.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2007 0238		
(22) Data depozit: 2007.09.03		
(51) : Int.Cl: <i>C07F 1/08</i> (2006.01) <i>C07C 49/303</i> (2006.01) <i>C07C 49/323</i> (2006.01) <i>C07C 337/08</i> (2006.01) <i>A61K 31/175</i> (2006.01) <i>A61K 31/30</i> (2006.01) <i>A61P 35/02</i> (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Inhibitor al leucemiei mieloide umane în bază de bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.2,7/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : Inhibitor al leucemiei mieloide umane în bază de bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.2,7/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato)cupru Ингибитор миелоидной лейкемии человека на основе бис(2-гидрокси-8-фенил-трицикло/7.3.1.0.2,7/-тридекан-13-он-тиосемикарбазонато)меди		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
MD 1994-2007 EA 1995-2007 SU 1970-1991, inclusiv și colecția „nepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3098 G2 2006.07.31	1,2
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2008.05.27	
Examinatorul	EGOROVA Tamara	